

Eine verbesserte Methode zum Nachweis
von antidiuretischem Hormon
mit Untersuchungen über den Hormongehalt
im menschlichen Plasma.

Eike - Friedrich Drews

1965

-I-

Aus der I.Med.Univ.-Klinik der Johann-Wolfgang-Goethe

Universität

F r a n k f u r t / M a i n

Direktor: Prof. Dr. med. F. Hoff

Eine verbesserte Methode zum Nachweis von antidiuretischem
Hormon mit Untersuchungen über den Hormongehalt im
menschlichen Plasma.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der gesamten Medizin

der hohen medizinischen Fakultät

der

Johann-Wolfgang-Goethe Universität

Frankfurt/Main

vorgelegt von

Eike-Friedrich Drews

aus Potsdam

Frankfurt/M. 1964

Referent : Prof.Dr.med. R.Heintz

Korreferent : Prof.Dr.med. E.Pfeiffer

Dekan : Prof.Dr.med. W.Rotter

Tag der mündlichen Prüfung : 12.11.1965



I n h a l t s ü b e r s i c h t

	<u>Seite:</u>
<u>I. Einleitung und Fragestellung</u>	2 - 6
<u>II. Methode</u>	7 - 14
a) Prinzip der Methode	7
b) Das Versuchstier	7
c) Vorbereitung der Versuchstiere	8
d) Versuchsanordnung	8
e) Durchführung des Versuchs	11
f) Injektionen	13
g) Auswertung	14
h) Osmolalitätsbestimmungen	14
i) Blutentnahme am Menschen	14
<u>III. Eigene Untersuchungen</u>	15 - 25
a) Empfindlichkeit der Methode	15
b) ADH-Gehalt im Plasma normal hydrierter Versuchspersonen	18
c) Untersuchungen über die Stabilität von ADH im Plasma	20
d) Änderungen des Plasma-ADH-Gehaltes im Durstversuch und nach Wasserbelastung	21
<u>IV. Erörterung der eigenen Befunde</u>	26 - 35
<u>V. Zusammenfassung</u>	36 - 37
<u>VI. Literaturverzeichnis</u>	38 - 41
<u>VII. Lebenslauf</u>	43

I. Einleitung und Fragestellung

Das antidiuretische Hormon, auch Adiuretin (=Vasopressin) genannt, wird im Nucleus supraopticus und paraventricularis des Zwischenhirns gebildet, über neurosekretorische Bahnen an den Hypophysenhinterlappen abgegeben und von hier in das Blut sezerniert. Das Hormon stellt ein zyklisches Oktapeptid dar, das speziesbedingte Unterschiede zeigt. Bei den meisten Säugern: Rind, Hund, Affe, Schaf, Kamel, Ratte u. a. sowie beim Menschen ließ sich zeigen, daß das antidiuretische Hormon in seiner Struktur ein Arginin-Vasopressin ist, welches in Position 8 in der Seitenkette seines Moleküls Arginin enthält.

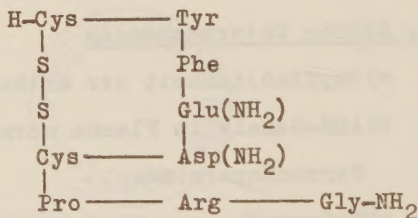


Abb. 1: Arginin-Vasopressin (32)

In dem Hypophysenhinterlappen von Schwein und Nilpferd dagegen hat man ein Hormon mit antidiuretischer Wirkung gefunden, das anstelle von Arginin Lysin besitzt. Dieses Lysin-Vasopressin wurde isoliert (29) und steht heute als synthetisches Vasopressin zur Verfügung.

Die beiden gebräuchlichen Bezeichnungen Adiuretin (ADH = antidiuretisches Hormon) und Vasopressin beziehen sich

auf die vasopressorische und die antidiuretische Wirkung dieses sogenannten Hypophysenhinterlappenhormons. Da die nachstehenden Erörterungen sich ausschließlich mit der antidiuretischen Wirkung befassen, wird deshalb von antidiuretischen Aktivitäten gesprochen werden, wenn es gilt, antidiuretische Effekte im menschlichen Plasma zu beschreiben. Von Vasopressin wird dagegen nur dann gesprochen, wenn die Wirkung eines synthetischen Präparates untersucht und charakterisiert werden soll.

Zum Nachweis der antidiuretischen Wirkung des antidiuretischen Hormons dient der biologische Test. Die bisher verfügbaren Methoden sind jedoch in ihrer Empfindlichkeit sehr unterschiedlich und teilweise unzureichend, so daß sie nur wenig zu exakten Vorstellungen über den ADH-Gehalt im menschlichen Plasma beitragen können.

So ist von BURN (1950) eine heute nicht mehr gebräuchliche Methode angegeben worden, mit deren Hilfe Untersuchungen über die Antidiurese an mit Wasser belasteten Ratten in Diuresekäfigen angestellt wurden. Man hat diese Methode in ihrem Prinzip unverändert weiterentwickelt (15, 16, 17) und angegeben, daß man 100-200 μ E ADH/ml Plasma nachweisen könne.

BUCHBORN (1955) verwendet als Versuchstier die Erdkröte, bei der Wasseraufnahme und Wasserabgabe aus dem äußeren oder an das äußere Medium (destilliertes Wasser) in Abhängigkeit von injiziertem ADH stehen sollen. Die Empfindlichkeit für den Nachweis von ADH wird bei dieser Methode mit 5 μ E/ml Injektionsvolumen angegeben (5, 7).

Weitere Versuche wurden an Mäusen (24), Kaninchen (23) und

an Hunden (31) durchgeführt. Die erzielte Empfindlichkeit betrug in den Versuchen an Kaninchen 500-1000 $\mu\text{E}/\text{ml}$ und an Hunden 250 $\mu\text{E}/\text{ml}$.

Die Vorstellungen über den ADH-Gehalt im menschlichen Plasma beruhten bisher auf Schätzungen und indirekten Berechnungen (29,33,34,35), die einen Wert von 1-2 $\mu\text{E}/\text{ml}$ Plasma angeben.

Aussagen verschiedener Autoren über die im biologischen Test gefundenen Werte unterliegen außerordentlich großen Schwankungen : so findet BUCHBORN (1957) in seinen Untersuchungen an der Erdkröte im menschlichen Plasma nach Flüssigkeitszufuhr 9 μE ADH/ml, im normal hydrierten Zustand 20 $\mu\text{E}/\text{ml}$ und nach Durst 50 $\mu\text{E}/\text{ml}$.

MAC FARLANE und ROBINSON (1957) dagegen geben in Versuchen im JEFFERS-Test (26) an der Ratte einen von den Jahreszeiten abhängigen Plasmaspiegel an, der von einem Mittelwert von 37 $\mu\text{E}/\text{ml}$ im Sommer ausgehend in Versuchen im Herbst 112 $\mu\text{E}/\text{ml}$ betragen, im Winter dagegen um 1/7 gegenüber den im Sommer gefundenen Werten geringer sein soll.

FRIEDBERG und VORHERR (1959) können in ihren Untersuchungen, ebenfalls im JEFFERS-Test, im Plasma von Personen im Wassergleichgewicht, bei Polyurie oder nach 24 Stunden Durst keine antidiuretischen Substanzen nachweisen.

HEINTZ und SCHNEIDER (1957, 1960, 1961) sehen einen antidiuretischen Effekt nach 24 stündigem Dursten, der 10 $\mu\text{E}/\text{ml}$ übersteigt und nach Flüssigkeitszufuhr absinkt.

Die Empfindlichkeit ihrer Methode im JEFFERS-Test lag bei 5-10 $\mu\text{E}/\text{ml}$ für Vasopressin.

Da alle genannten Werte über den ADH-Gehalt im menschlichen

Plasma stark voneinander und auch deutlich von dem errechneten ADH-Gehalt des Plasmas abweichen, bleiben sie unbefriedigend.

Nach den Experimenten von HELLER und LEDERIS (1958), die nur 400 mE eines Vasopressinpräparates mit einer chemischen Methode nachweisen konnten, ergab es sich, daß auch wir uns einer biologischen Methode zum Nachweis von ADH im menschlichen Plasma bedienen mußten.

Wir wandten uns der von JEFFERS und Mitarbeitern (1942) angegebenen Methode an der mit Wasser belasteten Ratte in Alkohalnarkose zu. Diese Methode ist inzwischen von einer Reihe von Autoren in verbesserter Form angegeben worden (4,9,10) und erreichte hier eine Empfindlichkeit von 20 μ E/ml Plasma.

Erst FRIEDBERG und VORHERR (1959) gelang es, im Rattentest durch Katheterisierung der Harnblase und Nachfüttern der ausgeschiedenen Flüssigkeit per os noch Hemmwirkungen mit 5 μ E Vasopressin zu erzielen.

Eine ebenso große Empfindlichkeit geben BERDE und CERLETTI (1961) an. In der von diesen Autoren modifizierten JEFFERS-Methode wird der Urinverlust an der Ratte durch die damit verbundene Gewichtsabnahme über einen Wäge-mechanismus registriert. Ein hiermit gekoppelter feed-back Mechanismus führt der Ratte stets soviel Wasser per os zu, bis der Gewichtsverlust ausgeglichen ist, so daß ein gleichmäßiger Flüssigkeitersatz erreicht wird.

Wesentlich gesteigert wird die Empfindlichkeit der Methode durch die Versuchsanordnung nach GAUER und TATA (1963), die den durch die Diurese der Ratte bedingten

Flüssigkeitsverlust durch 0,35 %ige NaCl-Lösung, gleichfalls mit Hilfe einer feed-back Anordnung, jedoch intravenös, ersetzen.

Wir machten es uns zur Aufgabe, die Methode weiter zu verfeinern, um mit größerer Wahrscheinlichkeit in den Nachweisbereich der im menschlichen Plasma vorhandenen Adiuretinmengen zu gelangen. Mit dieser Methode sollte außerdem eine nicht nur auf Schätzungen und indirekten Berechnungen basierende, sondern auf exakten Messungen und Beobachtungen im biologischen Test beruhende Angabe über den ADH-Gehalt im Plasma des Menschen bei verschiedenen Hydratationszuständen möglich sein.

Über diese Methode und die damit im menschlichen Plasma gefundenen ADH-Werte soll nachstehend berichtet werden.

II. Methode

a) Prinzip der Methode:

Weibliche Albinoratten werden mit Äthylalkohol narkotisiert, durch intravenöse Zufuhr von hypotoner NaCl-Lösung in eine Wasserdiurese versetzt und daran anschließend katheterisiert. Jeder ausgeschiedene Urintropfen wird registriert. Eine feed-back Anordnung sorgt für einen der jeweils ausgeschiedenen Harnmenge entsprechenden Flüssigkeitersatz. An den Versuchstieren werden bei intravenöser Applikation synthetisches Lysin-Vasopressin (gelöst in 0,4 %iger NaCl) und menschliches Plasma auf ihre anti-diuretische Aktivität, die sich in einer dosisabhängigen Abnahme der Rattendiurese aufzeigen läßt, getestet.

b) Das Versuchstier:

In einer Reihe von Vorversuchen konnten wir feststellen, daß sich ca. 180 g schwere weibliche Sprague Dawley Albino-Ratten besonders gut für unsere spezielle Versuchsanordnung eignen. Zu schwere Ratten zeigten sich oft nicht empfindlich genug gegenüber Vasopressininjektionen. Die gleiche Erfahrung konnte mit Tieren gemacht werden, die trächtig gewesen waren, sodaß auch solche Ratten nicht verwendet werden konnten.

Als besondere Forderung in der Auswahl von geeigneten Tieren wird von uns auf den Pflege- und Gesundheitszustand vor Versuchsbeginn geachtet und diejenigen Tiere, die nicht geeignet erscheinen werden aussortiert. Die unterschiedliche Eignung zum Katheterisieren der Ratten verschiedener

Stämme liegt in anatomischen Gegebenheiten begründet. Wir fanden, daß die Urethra der von uns untersuchten Rattenstämme in der dorsalen Wand eines Vestibulums mündet, welches vom Orificium externum urethrae ausgeht und an der Einmündung der Urethra eine wulstförmige Verdickung aufweist. Der von uns benutzte und oben angegebene Rattenstamm zeigte dieses wulstige Hindernis nur in so geringem Ausmaß, daß die Katheterisierung bei jedem Tier gelang.

c) Vorbereitung der Versuchstiere:

Die Ratten werden zwei Tage vor Versuchsbeginn 1 bis 2 mal täglich mit einer wässerigen Lösung, die 5,4% Glucose und 3% Aethylalkohol enthält, über eine Magensonde gefüttert. Die Flüssigkeitsmenge entspricht 5 % ihres Körpergewichtes. Am Morgen des Versuchstages erhält jedes Tier eine Wasserbelastung (Leitungswasser bei Zimmertemperatur - 5ml/100g Körpergewicht) und nach 90 min, ebenfalls durch die Magensonde, eine wässrige 12 %ige Aethylalkohollösung (97 %iger Aethylalkohol mit Leitungswasser verdünnt). Das Volumen der per os zugeführten Aethylalkohollösung entspricht 5-9 ml/100g Körpergewicht. Bei unzureichender Narkosetiefe werden 1-2 ml 12 %iger Aethylalkohol nachgefüttert.

d) Versuchsanordnung:

Ist das Versuchstier nach 30 bis 60 min so tief in Narkose, daß es ohne weiteres seine Lagerung auf den Rücken duldet, wird es in dieser Lage auf dem Operationstisch an den Vorder- und Hinterpfoten in Spreizstellung fixiert. Nun erfolgt das Ausrasieren der supraclaviculären Halsregion. Die Vena jugularis einer Seite wird aufgesucht

freipräpariert und mit Hilfe eines PVC-Schlauches (lichte Weite: 0,8 mm), der ca. 2 cm weit nach caudal in Richtung rechter Vorhof vorgeschoben wird, kanalisiert. Daran anschließend wird das Orificium externum urethrae mit der Pinzette gefaßt und leicht nach oben gezogen, während ein Glaskatheter zunächst in vertikaler Richtung so weit eingeführt wird, bis ein Widerstand zu spüren ist. Aus der vertikalen wird nun eine horizontale Führungsrichtung des Katheters, die mit der Längsachse des Tieres zusammenfällt. Auf diesem Wege rutscht der Katheter unter sehr geringem Druck leicht unter der Symphyse hindurch in die Harnblase.

Die Ableitung des Rattenharnes erfolgt über einen 40 mm langen konisch ausgezogenen Glaskatheter, der an seinem vorderen Ende schräg abgeschliffen ist und zusätzlich zu seiner Öffnung an der Spitze (Öffnungsdurchmesser: 0,8 mm) eine zweite Öffnung an der Oberseite zeigt.

Der Katheter wird über einen 40 cm langen PVC-Schlauch mit einer Woulfschen Flasche (Volumen: 500 ml) verbunden, die wiederum durch einen 25 cm langen Schlauch mit einer zweiten gleich großen Flasche gekoppelt ist. Aus dieser zweiten Flasche führt ein 15 cm langer Schlauch und endet 4 cm über einem Tropfenkontaktgeber in einer 16er Kanüle. Beide Woulfschen Flaschen werden bis an ihren oberen Rand mit einer wässrigen 50 %igen Methylalkohollösung und 1 g NaCl gefüllt und mit Gummistopfen verschlossen, die je zwei Öffnungen für den Durchtritt der Schläuche besitzen. Die Ebene der Einflußöffnungen liegt 40 cm unterhalb der Ausflußebene des Rattenurins. Auf die nähere

Bedeutung dieser Anordnung wird in Abschnitt e) eingegangen.

Die Schaltung des Tropfenkontaktgebers erfolgt über das Kaltkathodenrelais, den Zeitwähler, den Totalisator und den Infusionsmagneten. Als Spannungsquelle dient ein Gleichrichter, der eine Spannung von 6 Volt liefert (Abb.1).

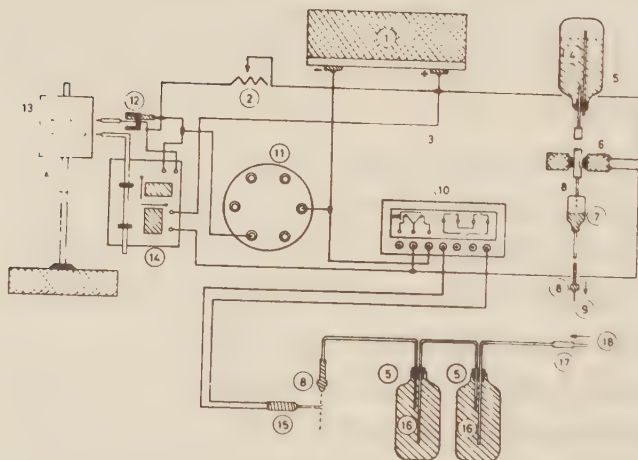


Abb.1 :Schema der Versuchsanordnung

Spannungsquelle (1),Widerstand (2),Stromkabel (3),
0,4 %ige NaCl (4),Infusionsflasche (5),Infusions=
magnet (6),Tropfsichtflasche (7),Kanüle (8),Vena
jugularis (9),Kalkathodenrelais (10),Zeitwähler
(11),Magnetsignal (12),Kymograph (13),Totalisator
(14),Tropfenkontaktgeber (15),Methylalkohol + NaCl
(16),Katheter (17),Blase/Versuchstier (18).

Ist der Blasenkatheter in die Blase der Ratte eingeführt, so wird daran anschließend der Jugulariskatheter mit dem Infusionssystem (5,6,7,8 in Abb.1) verbunden. Dieses Infusionssystem besteht aus einer mit 0,4 %iger NaCl-Lösung gefüllten Infusionsflasche (5), einem 120 cm langen Schlauch (lichte Weite: 1,2 mm), einer Tropfsichtflasche (7) und einer Spule mit beweglichem Eisenkern (Infusionsmagnet - 6). Im Ruhezustand verlegt dieser Eisenkern durch Druck von außen das Lumen des Schlauches, um es im gegebenen Augenblick freizugeben (s.u.). Die Infusionsflasche ist ca. 80 cm oberhalb der Ratte angebracht. (s. Abb. 1 + 2).

e) Durchführung des Versuchs:

Über das Infusionssystem werden dem Versuchstier zunächst 6 - 10 Tropfen einer 0,4 %igen NaCl-Lösung in einer Minute in die Jugularvene infundiert. Diese Tropfenzahl wird mit Hilfe einer Schlauchklemme an der Tropfsichtflasche einreguliert. Nach ca. 30 - 45 min setzt eine konstante Diurese ein, und jeder Urintropfen der Ratte muß nun zwangsläufig gleiche Volumina Flüssigkeit aus den beiden Woulfischen Flaschen verdrängen. Durch diese Anordnung gelingt es, Tropfen von konstanter, geringer Viskosität zu erhalten, deren Oberflächenspannung gegenüber derjenigen der Harntröpfen stark vermindert und weitgehend konstant ist. Dieses und der gegenüber dem Katheterlumen verengte Auslauf - 16ner Kanüle - am Ende der Woulfischen Flaschen bewirkt eine Erhöhung der Tropfenzahl. So ergeben 1 ml verdrängtes Flüssigkeitsvolumen aus den beiden Flaschen 17 Tropfen an der Kanüle. Ferner kann stets ein kurzdauernder Kontakt an dem Tropfenkontaktgeber geschlossen

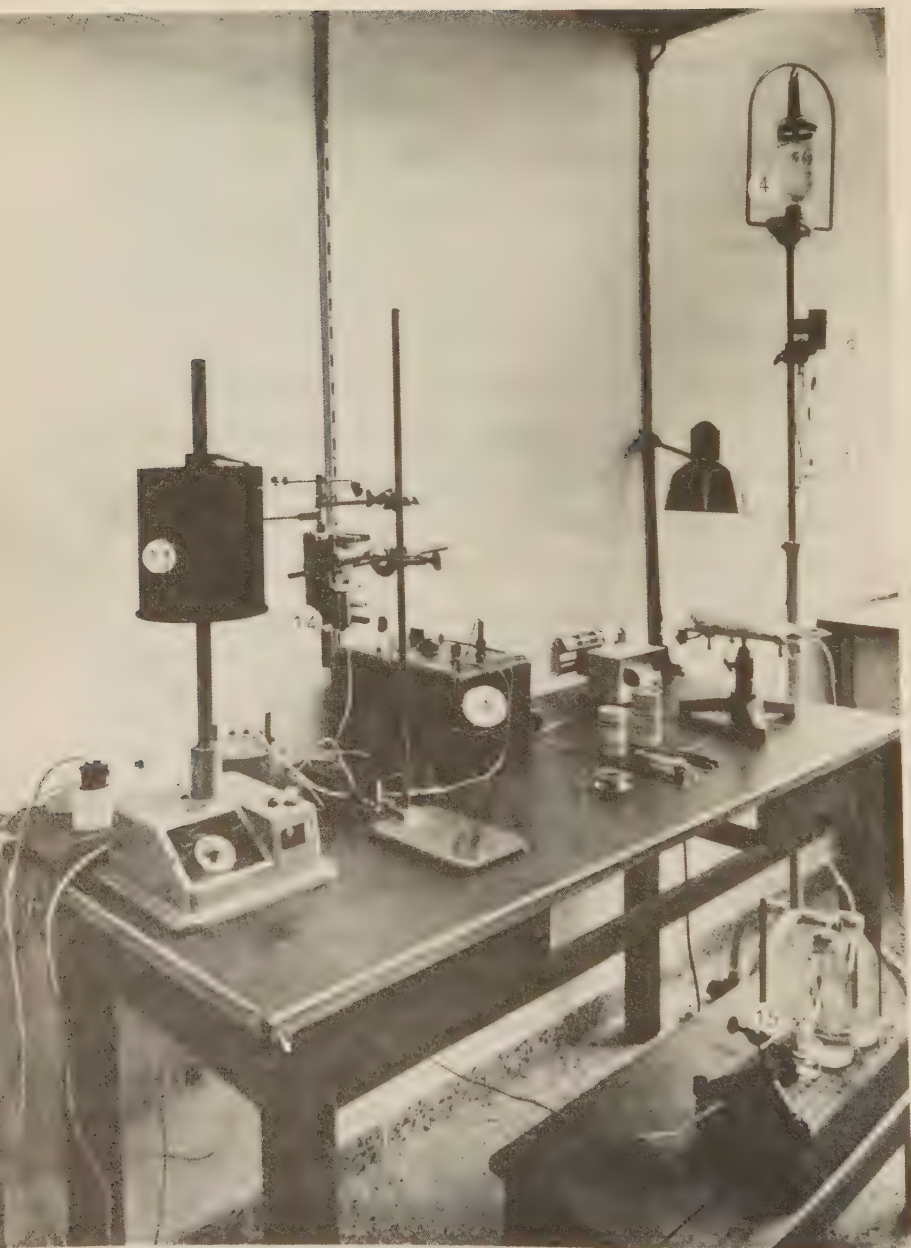


Abb.2 :Gesamtbild der Versuchsanordnung;

Die Ziffern beziehen sich auf die Legende zu Abb.1.

werden.

Jeder fallende Tropfen löst über den Tropfenkontaktgeber einen Impuls aus, der auf dem Wege über das Relais und den Totalisator auf dem beruhten Trommel-Kymographen registriert wird und gleichzeitig an dem Infusionsmagneten einen Induktionsstrom auslöst, sodaß durch Induktion des Eisenkerns das Lumen des Infusionsschlauches kurzfristig freigegeben wird. Auf diese Weise kann gerade ein Tropfen passieren, der dann an der Tropfsichtflasche sichtbar wird und in die Vena jugularis der Ratte nachfließt.

Mit einem Testtier kann man 3 bis 4 Stunden lang Untersuchungen über den ADH-Gehalt durchführen. Tritt währenddessen eine Hämaturie auf, so wird der Versuch abgebrochen. Sehr häufig muß während eines Versuches die Narkose vertieft werden. Zu diesem Zweck werden über eine Schlauchsonde 2 ml einer 24 %igen wässrigen Aethylalkohollösung mit Hilfe eines Dauerinfusionsgerätes nachgefüttert. Der Versuch ist während dieser Zeit zu unterbrechen und erst dann wieder aufzunehmen, sobald eine gleichmäßige Diurese eingetreten ist.

f) Injektionen:

Wir verwenden bei einer durchschnittlichen Tropfenzahl von 20 bis 30 in der Minute ein Injektionsvolumen von 0,5 ml, das innerhalb 30 Sekunden gespritzt wird. Die Infusion der 0,4 %igen NaCl-Lösung ist während jeder Injektion, die in die kanalisierte Jugularvene erfolgt, unterbrochen. Das Intervall zwischen den einzelnen Injektionen beträgt mindestens 20 min.

g) Auswertung:

Der Effekt einer antidiuretisch wirksamen Substanz wird in Prozent Retention (% R) angegeben, wobei die Tropfenzahl während 10 Minuten vor der Injektion mit 100 % und die in der gleichen Zeiteinheit nach der Injektion fehlenden Tropfen als x % eingesetzt werden.

$$x \% R = \frac{T_v - T_n}{T_v} \cdot 100$$

R = Retention

T_v = Tropfenzahl vor der Injektion

T_n = Tropfenzahl nach der Injektion

h) Osmolalitätsbestimmungen:

Die molare Konzentration des zu untersuchenden Plasmas wurde kryoskopisch nach Beckmann bestimmt. Benutzt wurde ein Osmometer der Fa. Schulze/Heppenheim, die Standardabweichung betrug bei einer Osmolalität von 305 mosm : $305 \pm 2,84$ mosm.

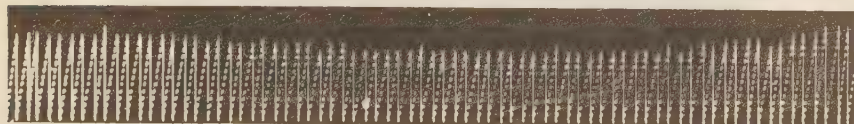
i) Blutentnahme am Menschen:

Zur Plasmagewinnung von den zu untersuchenden Versuchspersonen wird Blut aus der Cubitalvene entnommen, heparinisiert und 10 min bei 2400 g zentrifugiert. Bis zum Test auf antidiuretische Aktivitäten ist das so gewonnene Plasma bei -5°C aufzubewahren.

III. Eigene Untersuchungen

a) Empfindlichkeit der Methode:

Die Empfindlichkeit der Methode wurde durch Testinjektionen von Lysin-Vasopressin in die Jugularvene des narkotisierten Versuchstieres ermittelt. Dabei interessiert uns vornehmlich die untere Nachweisgrenze, zu deren Bestimmung 0,5 μ E (a) - 0,4 μ E (b) - 0,3 μ E (c) - 0,2 μ E (d) und 0,1 μ E (e) injiziert wurden (Abb.4). In allen Fällen läßt sich eine von jeder einzelnen Dosis abhängige Wirkung zeigen (Tab.1). Die nachstehende Legende zu Abbildung 3 gibt eine Erläuterung darüber, wie die Kurven in den folgenden Abbildungen zu verstehen sind.



720 646
0,1 μ E

10 % R

Abb.3 : Der Pfeil $\uparrow$ 0,1 μ E gibt an, daß zu diesem Zeitpunkt 0,1 μ E synthetisches Lysin-Vasopressin injiziert worden sind. Jeder punktförmige Absatz auf den vertikal ansteigenden Linien entspricht einem Tropfen, der die Woulfscen Flaschen an der Kanüle (Abb.2) verläßt. Die vertikalen Linien geben also die Summe der Tropfen in einer an dem Zeitwähler einregulierten Zeiteinheit, hier 10 Sekunden, an. Das Injektionsvolumen beträgt in allen Versuchen jeweils 0,5 ml. Die prozentuale Retention, hier 10 % Retention, läßt sich nach der auf Seite 14 angegebenen Formel aus der Summe der Tropfen vor und nach der Injektion errechnen. Die Kurve zeigt ferner, daß nach 6 vertikalen

Linien, also nach 60 Sekunden, ein antidiuretischer Effekt post injectionem zu verzeichnen ist. Zu diesem Zeitpunkt werden 1 Tropfen in 10 Sekunden, das sind 6 Tropfen in einer Minute, weniger registriert. Nach $49 \times 10 \text{ sec} = 8 \text{ min und } 10 \text{ sec}$ kommt es in dieser Kurve zu einem Wiederanstieg der Diurese. Die Tropfenzahl vor der Injektion (T_v) beträgt : 720, nach der Injektion (T_n) : 646 in der jeweils gleichen Zeiteinheit von 10 min.

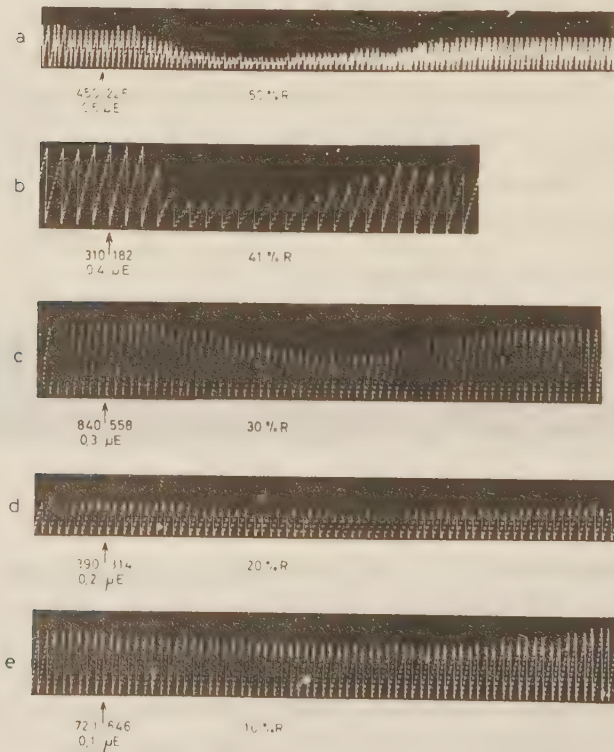


Abb.4 :Die Kurven a bis e geben den Effekt von synthetischem Lysin-Vasopressin wieder.Details betr. Registrierung wie in der Legende zu Abb.3 (S.15).Zeiteinheiten für die Kurven a,c,d,e = 10 sec ; b = 30 sec.

Eine Reihe weiterer Ergebnisse werden in Abbildung 5 wiedergegeben.

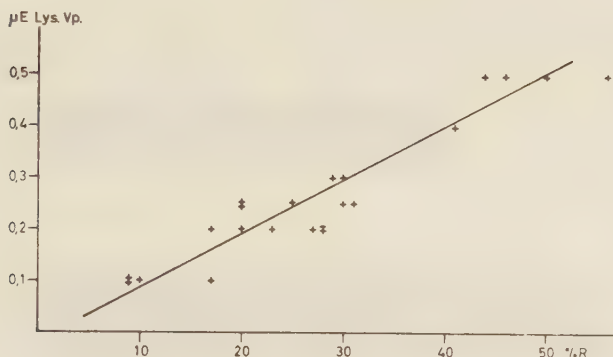


Abb.5 :Das injizierte Lysin-Vasopressin in µE ist auf der Ordinate gegen die effektive Wirkung auf der Abszisse (% Retention) aufgetragen.

Es läßt sich an Hand dieser Ergebnisse zeigen, daß die Empfindlichkeit der Methode bei 0,1 µE/0,5 ml Injektionsvolumen liegt. In Tabelle 1 ist eine Berechnung des arithmetischen Mittelwertes in % Retention und des daraus resultierenden mittleren Fehlers der Injektionseinheiten 0,1; 0,2; 0,25 und 0,5 µE angegeben. Die Berechnung der mittleren quadratischen Abweichung (=mittlere Abweichung, = Streuung) erfolgte nach dem Ausdruck :

$$s = \sqrt{\frac{\sum (n\delta^2)}{N}}$$

s = mittlere quadratische Abweichung

Σ = Zeichen der Addition

n = Häufigkeit einer bestimmten Variante

δ = Abweichung vom Mittelwert

M = Gesamtzahl der Varianten

Versuch Nr.	μE Lys . Vp.	Zahl der Versuche	arithmetr. Mittelwert in % R	mittlerer Fehler
1	0,1	4	11,25	$\pm$ 3,4
2	0,2	6	23,82	$\pm$ 4,2
3	0,25	5	25,20	$\pm$ 4,7
4	0,5	4	49,00	$\pm$ 4,2

Tabelle 1 :Berechnung des arithmetrischen Mittelwertes
und der mittleren quadratischen Abweichung.

b)ADH-Gehalt im Plasma normal hydrierter Versuchspersonen:

Untersucht wurde das Plasma von 5 normal hydrierten Versuchspersonen,d.h. die Flüssigkeitszufuhr war ihnen in den Stunden vor der Untersuchung freigestellt.Es wurden dem Versuchstier jeweils 0,5 ml Plasma in die Jugularvene injiziert.Bei allen 5 Versuchen können eindeutig reproduzierbare antidiuretische Effekte an der Rattendiurese registriert werden.Die Ergebnisse werden in der Tabelle 2 und in den Kurven a bis e der Abbildung 6 wiedergegeben und ausgewertet.

Versuch Nr.	Urintropfen/10min vor Injektion	nach Injektion	% Retention	ADH-Gehalt in 0,5 ml Plasma= μE Lys.Vp.
26	360	312	13	0,1
27	510	419	18	0,2
28	140	130	7	0,1
29	110	102	7	0,1
30	380	301	20	0,2

Tabelle 2 :Die vorstehende Tabelle zeigt eine Zusammenstellung der Ergebnisse über den ADH-Gehalt im Plasma von 5 Versuchspersonen.

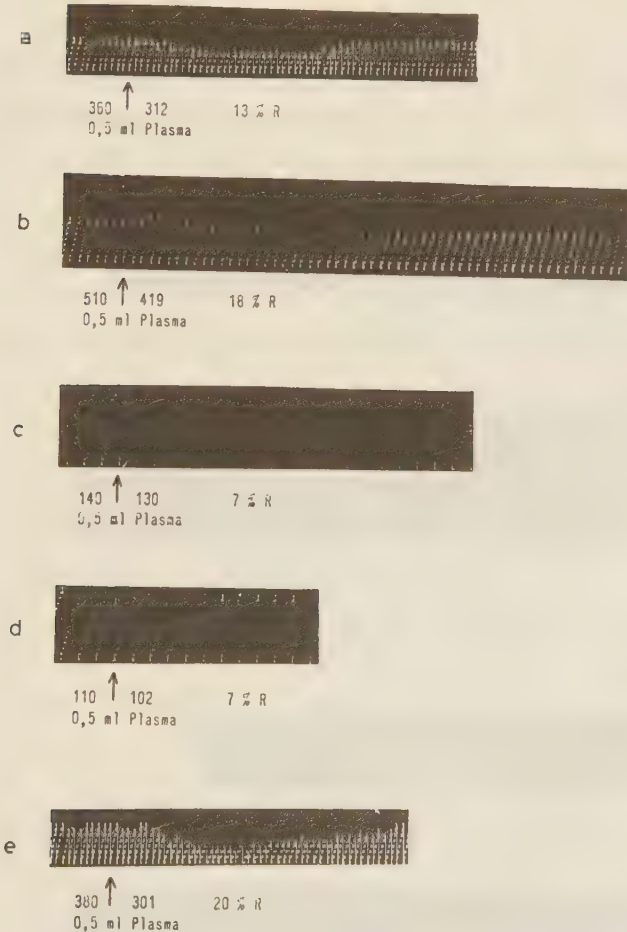


Abb.6 :Die Kurven a bis e geben den Plasmatest an 5 Versuchspersonen wieder (s.h. Text).Details betr. Registrierung wie in der Legende zu Abb.3 (S.15). Zeiteinheiten für die Kurven a,b und e = 10 sec, c und d = 30 sec.

c) Untersuchungen über die Stabilität von ADH im Plasma:

Das Plasma von zwei normal hydrierten Versuchspersonen wurde bei -5°C über einen Zeitraum von 14 (Abb.7; Kurve a und b) und 21 Tage (Abb.7; Kurve c und d) aufbewahrt und anschließend im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Eine Prüfung auf ADH vor und nach dem Einfrieren des Plasmas läßt, wie Abbildung 7 zeigt, keinen Verlust an antidiuretischen Aktivitäten erkennen.

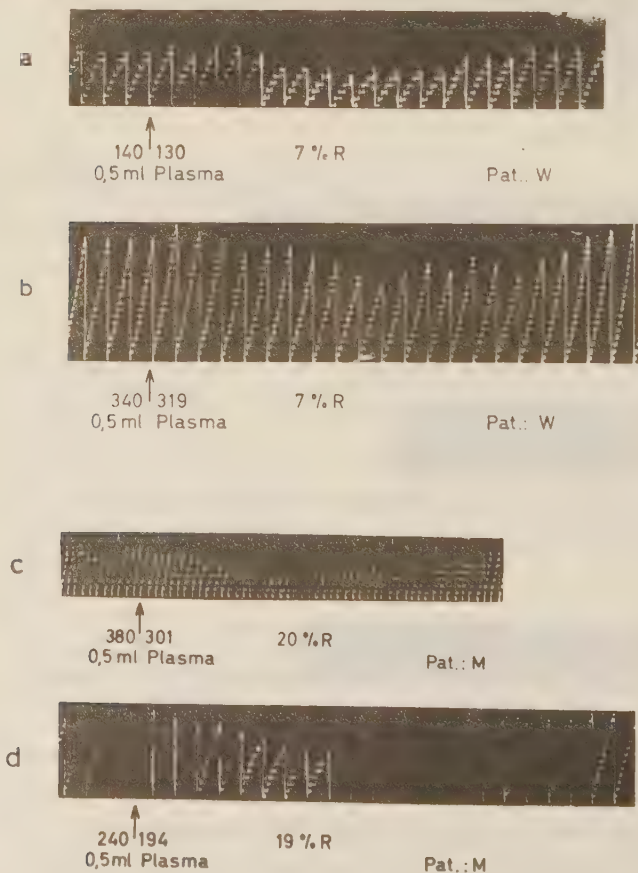


Abb.7 : Kurve a = Test am 27.11.63; ZE = 30 sec.

Kurve b = Test am 11.12.63; ZE = 30 sec.

Kurve c = Test am 20.11.63; ZE = 10 sec.

Kurve d = Test am 11.12.63; ZE = 30 sec.

Bei den Kurven a und b sowie c und d handelt es sich jeweils um das gleiche Plasma, Details betr. Registrierung wie in der Legende zu Abb.3 (S.15).
ZE = Zeiteinheit.

d) Änderungen des Plasma-ADH-Gehaltes im Durstversuch und
nach Wasserbelastung:

Eine 25 jährige und 79 kg schwere männliche Versuchsperson blieb über 24 Stunden ohne Flüssigkeitszufuhr und wurde nach Ablauf dieser Zeit mit Wasser in Form von 1500 ml Tee belastet. Unmittelbar vor und nach der Durstperiode und daran anschließend 60, 120, 180 und 340 min nach der oralen Wasserzufuhr wurden Blutproben zur Bestimmung der Osmolalität im Plasma und zur Prüfung auf ihren Gehalt an antidiuretischen Substanzen entnommen. Ferner Harnproben zur Bestimmung der Osmolalität im Urin und zur Registrierung der insgesamt ausgeschiedenen Harnmenge.

Im normal hydrierten Zustand unmittelbar vor dem Dursten zeigt sich eine Osmolalität im Plasma von 301 mosm, im Harn von 990 mosm. Ein Test auf ADH im Plasma ergibt eine Retention von 13 % (= 0,2 μ E/1 ml ADH; Abb.8, Kurve a).

Nach 24 stündigem Dursten steigt die Osmolalität im Plasma auf 322 mosm und im Harn auf 1243 mosm an, die antidiuretische Aktivität im Plasma ergibt eine Retention von 40 % (= 0,8 μ E/1 ml ADH; Abb.8, Kurve b). Der Versuchsperson wurden nun innerhalb von 30 min 1500 ml Tee zugeführt. Eine 30 min danach erfolgte Osmolalitätsbestimmung im Plasma zeigt einen Wert von 320 mosm, im Harn 1157 mosm, die antidiuretische Aktivität liegt bei 39 % Retention an der Rattendiurese (= 0,8 μ E/1ml ADH; Abb.8, Kurve c).

Erst nach weiteren 60 min sinkt die Osmolalität des Plasmas auf 312 und im Urin auf 231 mosm, die antidiuretische Aktivität auf 23 % Retention ab ($= 0,5 \mu\text{E}/1\text{ml ADH}$; Abb.8, Kurve d). Die 180 und 340 min nach dem Dursten gewonnenen Blutproben ergeben Werte im Plasma von 322 und 317 mosm und im Harn von 333 und 688 mosm. Die antidiuretische Aktivität kann zu diesem Zeitpunkt mit 26 % Retention ($= 0,5 \mu\text{E}/1 \text{ ml ADH}$; Abb.8, Kurve e) und mit 25 % Retention ($= 0,5 \mu\text{E}/1 \text{ ml ADH}$; Abb.8, Kurve f) angegeben werden (Abb.8 und 9).

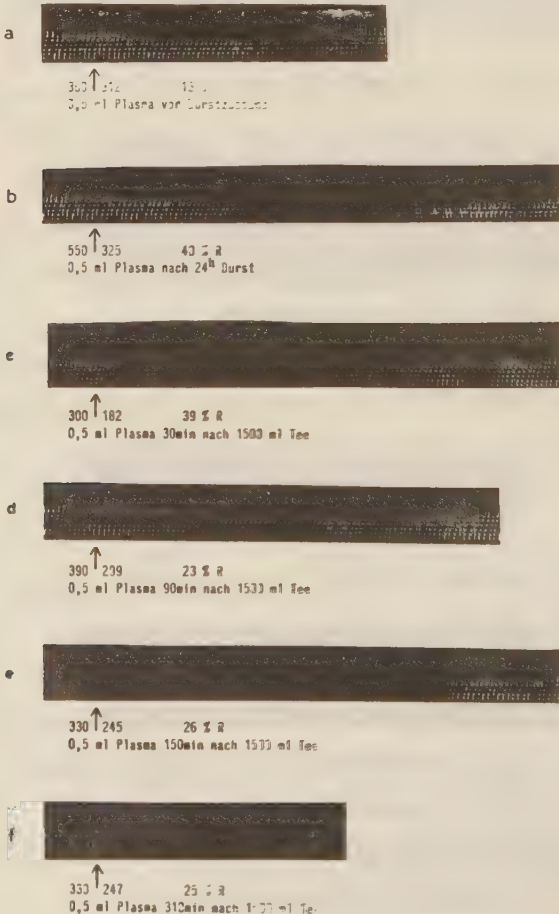


Abb.8 :Die Kurven a bis f geben den Durstversuch an der Versuchsperson E.D.(s.h.voranstehenden Text)wieder. Registrierung und Details wie in der Legende zu Abb.3 (S.15).Zeiteinheit = 10 sec.

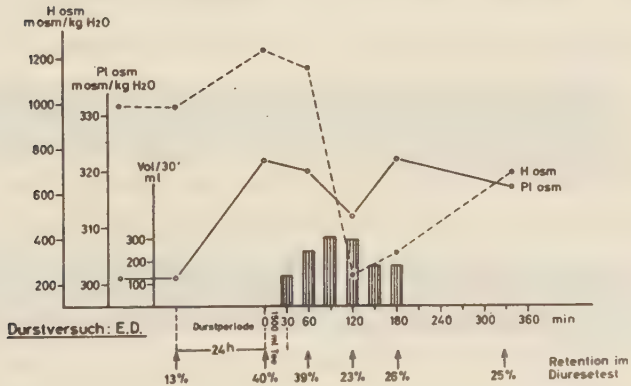


Abb.9 :Änderung des osmotischen Druckes im Plasma (Pl osm in mosm/kg H₂O) und der Harnosmolalität (H osm in mosm/kg H₂O).Vol= Urinvolumen in 30 min, sowie antidiuretische Aktivitäten in % Retention (% R) im Versuch vor und nach Durst und nach Wasserbelastung.

Der zweite Durstversuch wurde an einer 24 jährigen und 57 kg schweren weiblichen Person durchgeführt. Plasma- und Urinteste auf Osmolalitäten und antidiuretische Aktivitäten erfolgten unmittelbar vor dem Dursten, nach dem Dursten und 75, 195 und 295 min nach der Wasserbelastung in Form von 1500 ml Tee. Die Durstperiode betrug ebenfalls 24 Stunden. Die Prüfung der antidiuretischen Aktivitäten im normal hydrierten Zustand vor dem Dursten ergibt bei

einer Osmolalität im Plasma von 312 mosm und im Urin von 1051 mosm 18 % Retention (= 0,3 μ E ADH/ml Plasma; Abb.11, Kurve a). Nach 24 stündigem Durst kommt es auch in diesem Versuch zu einer vermehrten antidiuretischen Aktivität im Plasma, so daß sich jetzt 46 % Retention nachweisen lassen - Osmolalität im Plasma zu diesem Zeitpunkt : 322 mosm, im Harn : 1140 mosm (= 1 μ E ADH/ml Plasma; Abb.11, Kurve b). Die Flüssigkeitsbelastung durch 1500 ml Tee über einen Zeitraum von 30 min führt 30 min nach ihrer Beendigung zu einem raschen Abfall der Harnosmolalität auf 604 mosm und im Plasma auf 306 mosm, während sich bei der Bestimmung von ADH nur 4 % Retention ergeben (= 0,1 μ E ADH/ml Plasma; Abb.11, Kurve c). 165 min nach der Flüssigkeitszufuhr kann mit unserer Methode kein antidiuretischer Effekt mehr im Rattendiuresetest erzielt werden (Abb.11, Kurve d). Im Plasma findet sich eine Osmolalität von 301 und im Harn von 102 mosm. Erst nach weiteren 90 min steigt die Osmolalität im Plasma auf 312 und im Urin auf 140 mosm an (s.h. Abb.10 und 11).

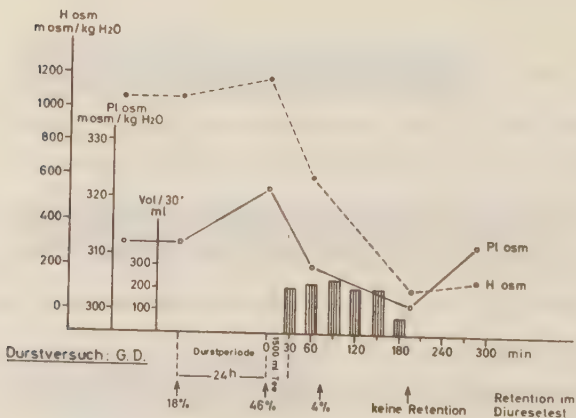


Abb.10 :Änderung des osmotischen Druckes im Plasma
(Pl osm in mosm/kg H_2O) und der Harnosmolalität
(H osm in mosm/kg H_2O). Vol = Urinvolumen in 30 min,
sowie antidiuretische Aktivitäten in % Retention
(% R) im Versuch vor und nach Durst und nach
Wasserbelastung.

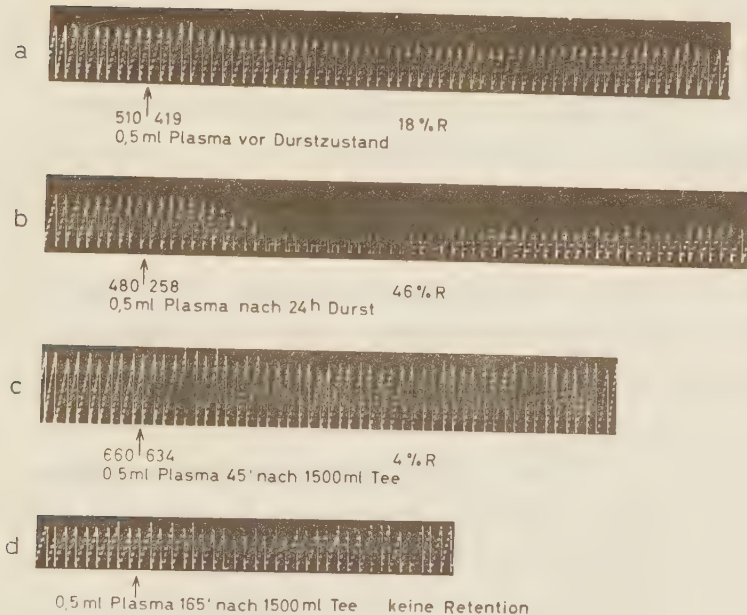


Abb.11 :Die Kurven a bis d geben den Durstversuch an der
Versuchsperson G.D. wieder.Details betr.
Registrierung wie in der Legende zu Abb.3 (S.15).
Zeiteinheit = 10 sec.

IV. Erörterung der eigenen Befunde

Mit der von uns ausgearbeiteten Methode ist es gelungen, eine außerordentliche Empfindlichkeitssteigerung gegenüber den bisher bekannten Methoden für den Nachweis von Adiuretin zu erzielen. Dies ist in erster Linie

1. durch die Auswahl von geeigneten Versuchstieren,
2. ihre Vorbereitung zur Erzielung eines Stadiums der Wasserdiurese vor Versuchsbeginn,
3. die „feed-back“ Anordnung, die einen konstanten Flüssigkeitersatz gewährleistet,
4. die Woulfscen Flaschen zur Steigerung der Tropfenzahl erreicht worden. Die Verknüpfung dieser Einzelfaktoren ermöglicht uns den Nachweis von $0,1 \mu\text{E}$ Lysin-Vasopressin in einem Injektionsvolumen von $0,5 \text{ ml}$. Da für Lysin-Vasopressin ein Molekulargewicht von ca. 1000 angesetzt werden kann, entsprechen einem Mol Lysin-Vasopressin 1000 g desselben Hormons in Gewichtseinheiten. Die Loschmidt'sche Zahl gibt an, daß in einem Mol einer Lösung $6,023 \cdot 10^{23}$ Moleküle vorhanden sind. Daraus folgt, daß 1000 g Lysin-Vasopressin $6,023 \cdot 10^{23}$ Moleküle enthalten. Da ferner 1 E Lysin-Vasopressin 4 gamma desselben Hormons in Gewichtseinheiten entsprechen, sind in dem Injektionsvolumen von $0,5 \text{ ml}$ einer $0,1 \mu\text{E}$ Lysin-Vasopressin enthaltenden Lösung ca. $4 \cdot 6,023 \cdot 10^7$ Moleküle des Hormons vorhanden. Diese gerade noch nachzuweisende Vasopressinmenge entspricht $4 \cdot 10^{-7}$ gamma Substanz. Ein antidiuretischer Effekt kann also mit Sicherheit auch

noch bei derart kleinen Mengen erwartet werden (Abb.3;S.15).

In Abbildung 5 ist dargestellt,daß die Wirkung von injiziertem Vasopressin immer wieder reproduziert werden kann.Injektionen von 0,5 ml einer isotonen NaCl-Lösung zeigten in keinem Fall eine Veränderung der Rattendiurese. An Hand der abgebildeten Kurven ist zu erkennen,daß der antidiuretische Effekt erst nach ca. 60 sec eintritt.

Diese Latenzzeit ist abhängig:

- 1.von der Geschwindigkeit,mit der Vasopressin von der Jugularvene aus an den Wirkungsort gelangt,
- 2.von der „delay time“,die von der Länge des harnableitenden Systems und von der Geschwindigkeit,mit der jeder gebildete Tropfen diese Strecke vom Glomerulus bis zum Orificium externum urethrae durchläuft, abhängig ist.
- 3.Eine weitere Verzögerung erfolgt durch die Länge des Katheters,des sich daran anschließenden Schlauches und durch die Woulfischen Flaschen.

Nach einer durchschnittlich 10 min anhaltenden anti-diuretischen Phase kommt es in allen unseren Versuchen wieder zu einem Anstieg der Rattendiurese, die innerhalb von 2 bis 3 min ihren Ausgangswert erreicht hat.

Eine Beziehung zwischen den injizierten Vasopressinkonzentrationen und den retinierten Wassermengen läßt sich nur an der relativen Retention aufzeigen.Betrachtet man das Verhältnis von Ausgangsdiurese zur Antidiurese absolut, so ist festzustellen,daß bei einer hohen Ausgangsdiurese gegenüber einer geringeren mehr Wasser retiniert wird. Die absolute Menge der retinierten Flüssigkeit ist folglich abhängig von der Höhe der Ausgangsdiurese (Tabelle 3).

μE Lys.Vp.	Urintropfen/10min vor Injektion	nach	relative Retention %	absolute Retention Tropfen
0,1	720	646	10	74=4,4ml H_2O
0,1	588	532	9	56=3,4ml H_2O
0,1	330	302	9	28=1,7ml H_2O

Tabelle 3 :Beziehung zwischen der relativen und der absoluten Retention nach Injektionen von 0,1 μE Lysin-Vasopressin an der Rattendiurese.

Aus diesen Gründen ist es fraglich, ob jedes Molekül Vasopressin eine konstante Anzahl von Molekülen Wasser retiniert, wie es von manchen Autoren angenommen wird (13,14).

An dieser Stelle sei auf die Untersuchungen von BERDE und CERLETTI (1961) hingewiesen, die die Dosiswirkungskurven von synthetischem Lysin-Vasopressin und dem internationalen Hypophysenhinterlappenstandard (HHL-St.), welcher Arginin-Vasopressin enthält, aufgestellt haben. Es läßt sich nach ihren Befunden zeigen, daß die Steigung der beiden Kurven erst bei Injektionen von mehr als 10 μE beider Hormone voneinander abweichen. Aus diesem Grunde ist es uns erlaubt, die Wirkungen von synthetischem Lysin-Vasopressin und dem im Plasma des Menschen vorkommenden Arginin-Vasopressin im physiologischen Bereich direkt zu vergleichen.

In Untersuchungen an 5 Versuchspersonen im Wassergleichgewicht gelang es, mit unserer Methode erstmals sicher reproduzierbare antidiuretische Effekte mit menschlichem Plasma in einer Größenordnung nachzuweisen, die sehr wahrscheinlich dem realen Gehalt des Plasmas an ADH

entspricht. Die bisher hierüber in der Literatur vorliegenden Arbeiten geben Werte an, die mit Nachweismethoden gewonnen wurden, deren Empfindlichkeit mindestens um das 30 bis 50 fache unter der unseren Methode liegen. Im Rattendiuresetest (Abb. 6, Kurven a bis e; Tabelle 2) zeigen in unseren Untersuchungen 0,5 ml Plasma jeweils einen antidiuretischen Effekt, der in seiner Wirkung derjenigen von 0,1 bis 0,2 μ E Lysin-Vasopressin und einem ADH-Gehalt im Plasma von 0,2 bis 0,4 μ E/ml Injektionsvolumen entspricht. Das bedeutet, daß in 100 ml Plasma demnach ungefähr 20 bis 40 μ E Adiuretin und im Gesamtplasma eines 70 kg schweren Menschen rund 0,84 mE ADH vorhanden sind, wenn man als den normalen Durchschnitt ein Plasmavolumen von 2,8 Ltr. bei einem Blutvolumen von 5 Ltr. ansetzt.

AMES und VAN DYKE (1951) geben an, daß es möglich sei, Vasopressin - z.B. 450 μ E Pitressin - mit Hilfe von Na-Thioglykolat zu inaktivieren. Die Versuche wurden im biologischen Test an der Ratte nach BURN durchgeführt. Im physiologischen Bereich für ADH im Plasma und für synthetisches Lysin-Vasopressin in der Größenordnung von weniger als 1 μ E/ml konnten wir mit unserer Methode jedoch keine Aufhebung eines antidiuretischen Effektes durch Na-Thioglykolat, der z.B. nach Injektion von synthetischem Lysin-Vasopressin erwartungsgemäß eingetreten war, erreichen. Andererseits war nach Injektion von Na-Thioglykolat allein eine Antidiurese zu beobachten.

Um die im Plasma gefundenen antidiuretischen Effekte eindeutig mit ADH zu identifizieren, können wir uns daher nicht auf die Inaktivierung durch Na-Thioglykolat verlassen,

sondern müssen uns auf folgende Forderungen von KAUFMANN (1953) sowie HEINTZ und SCHNEIDER (1960) stützen :

1. Anstieg der antidiuretischen Aktivität im Durstversuch - Abnahme nach Wasserbelastung.
2. Qualitative Vergleichbarkeit der antidiuretischen Wirkung von synthetischem Vasopressin und dem angeblich ADH enthaltenden Plasma.
3. Fehlen der antidiuretischen Aktivität im Plasma eines Patienten mit Diabetes insipidus.

Wir unterwerfen unsere Methode und Ergebnisse folgender weiteren Bedingung :

4. Um einen antidiuretischen Effekt an der Rattendiurese als Vasopressinwirkung anzusehen - (sowohl nach Vasopressin- als auch nach Plasmainjektionen) - , muß bei Verwendung von jeweils neuen Tieren, an denen unter gleichen Bedingungen entsprechend dem vorangehenden Versuch zu experimentieren ist, auch noch nach Tagen der gleiche Effekt reproduzierbar sein.

Wir haben unsere Methode und Ergebnisse auf diese 4 Kriterien hin geprüft :

Es kann gezeigt werden, daß im Durstversuch die antidiuretische Aktivität stark ansteigt und nach reichlicher Flüssigkeitszufuhr signifikant absinkt (Abb. 8 und 11).

Als Beweis dafür, daß sich keine qualitativen Unterschiede zwischen den Effekten nach Plasma- oder nach Vasopressininjektionen aufdecken lassen, seien die Kurven a und b der Abbildung 12 miteinander verglichen. Die Kurve a gibt einen antidiuretischen Plasmaeffekt einer gesunden Versuchsperson nach 10 stündigem Dursten wieder, während in der

Kurve b der Effekt von synthetischem Lysin-Vasopressin dargestellt ist. Beide Kurven vermögen zu bestätigen, daß wohl quantitative Unterschiede auf Grund der verschiedenen starken ADH-Konzentrationen in den Injektionsvolumina nicht aber qualitative Unterscheidungen getroffen werden können (Abb.12).

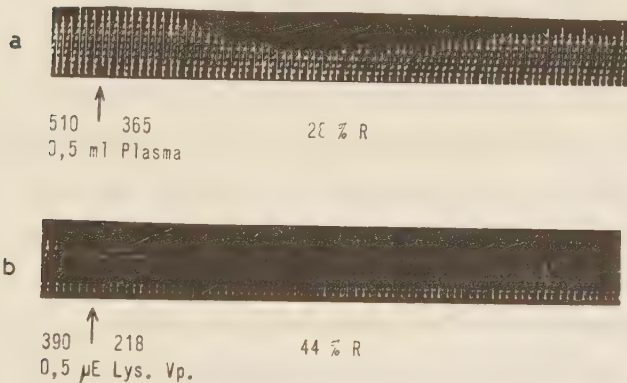


Abb.12 :Kurve a = Plasmaeffekt nach 10^h Durst
Kurve b = 0,5 µE Lysin-Vasopressin
Details betr. Registrierung wie in der Legende
zu Abb.3 (S.15). Zeiteinheit = 10 sec.

Schließlich lassen sich beim Diabetes insipidus auch nach mehrstündigem Dursten im Rattendiuresetest keine antidiuretischen Aktivitäten nachweisen (11).

Die Untersuchungen über die Stabilität von ADH im Plasma (Abb.7) erfüllen auch die letzte unter 4. angeführte Forderung, da auch noch nach 14 bzw. 21 Tagen Aufbewahrung im Tiefkühlfach im Plasma kein Aktivitätsverlust festzu-

stellen ist. Die Bedeutung dieser Untersuchung liegt, neben ihrer Beweiskraft für die Reproduzierbarkeit der Methode, in der Möglichkeit, Plasmafraktionen so lange sammeln zu können, bis ein Test auf antidiuretische Aktivitäten durchgeführt werden kann.

Die Aufrechterhaltung eines normalen osmotischen Druckes im Blut wird durch die renale Wasserabgabe bzw. Wasserretention gewährleistet und dieser Vorgang als Osmoregulation bezeichnet (36). Wird das Flüssigkeitsvolumen in der Blutbahn z.B. durch Trinken großer Flüssigkeitsmengen erhöht, so kommt es zu einer Verminderung des osmotischen Drucks im Blut. Dursten dagegen führt zu einer Verminderung des Blutvolumens und damit zu einem Anstieg des osmotischen Drucks. Diese Änderungen der Osmolalität des Blutes sollen durch die Osmorezeptoren im Gebiet der Carotis interna registriert werden und auf nervalem Wege bei einem Absinken der Osmolalität zu einer verminderten, bei einem Anstieg dagegen zu einer vermehrten Abgabe von ADH aus dem Nucleus supraopticus und paraventricularis an den Hypophysenhinterlappen und das Blut führen. Der Wirkungsort des Adiuretins ist die Niere, die auf eine vermehrte ADH-Ausschüttung mit einer Wasserretention auf verminderte dagegen mit erhöhter Wasserausscheidung antwortet. Unsere Versuche am Menschen im Durstzustand und nach starker Wasserzufuhr (1500 ml Tee) können die enge Beziehung zwischen den Änderungen der Osmolalität und der damit verbundenen ADH-Ausschüttung im Experiment aufzeigen. So läßt sich nach einer 24 stündigen Durstperiode (Abb. 9) ein Anstieg der Osmolalität von 301 auf 322 mosm

im Plasma und eine Erhöhung des ADH-Plasmaspiegels von 0,2 μE auf 0,8 $\mu\text{E}/\text{ml}$ Plasma nachweisen. Dieser erhöhte Adiuretin-Gehalt des Blutes bewirkt die Ausscheidung eines stark konzentrierten Harns von 1243 mosm. Ein daran anschließender Wasserstoß senkt 120 min nach Beginn der Flüssigkeitszufuhr die Osmolalität im Plasma auf 312 mosm. Die Osmorezeptoren antworten auf die Verminderung des osmotischen Druckes mit der Aussendung von verminderten Impulsen an die Bildungs- und Speicherzentren für ADH und hemmen auf diese Weise seine Ausschüttung. Tatsächlich lassen sich zu diesem Zeitpunkt nur noch 0,4 μE ADH/ml Plasma nachweisen, die Osmolalität im Urin ist auf 231 mosm abgefallen und die ausgeschiedene Urinmenge hat ihr Maximum erreicht. Die hohe Latenzzeit vom Ende der Wasserzufuhr bis zum Zeitpunkt der stärksten Diurese von 90 min läßt sich durch die Einnahme einer Mittagsmahlzeit 30 min vor Beendigung der Durstperiode und dadurch, daß der Organismus zunächst bestrebt ist, die Flüssigkeitsdepots wieder aufzufüllen, erklären.

Die weibliche Versuchsperson (Abb. 10) blieb während der letzten 10 Stunden der Durstperiode ohne jegliche Nahrungsaufnahme. Am Vortage werden vor dem Dursten 0,3 $\mu\text{E}/\text{ml}$ Plasma sowie eine Osmolalität von 312 mosm im Blut und 1051 mosm im Harn festgestellt. Der Flüssigkeitsentzug läßt nach 24 Stunden die Osmolalität im Plasma auf 322 mosm ansteigen und veranlaßt den Hypophysenhinterlappen zu einer vermehrten Abgabe von ADH, um die renale Wasserexkretion möglichst gering zu halten. Zu dieser Zeit sind 0,9 μE ADH in einem ml Plasma nachweisbar. Die anschließend durch-

geführte Wasserzufuhr vermindert bereits 30 min später die Osmolalität im Plasma auf 306 mosm und senkt den ADH-Plasmaspiegel auf 0,1 $\mu\text{E}/\text{ml}$. Der Effekt zeigt sich in einer verstärkten renalen Wasserexkretion mit dem Absinken der Osmolalitätswerte im Harn auf 604 mosm. Nach weiteren 135 min können keine antidiuretischen Aktivitäten mehr festgestellt werden, dies entspricht auch dem Abfall der Osmolalität im Plasma auf 301 mosm und im Harn auf 102 mosm. Es läßt sich also in allen Fällen eine enge Korrelation zwischen der Änderung der ADH-Konzentration und den Osmolalitätswerten bei verschiedenen Hydratationszuständen im Plasma aufzeigen.

BUCHBORN (1956) gibt an, daß der Adiuretin-Plasmaspiegel dem $\log$ der Serumwasserkonzentration (= $\log$ des reziproken Wertes der Serumosmolarität) proportional sei. In Abbildung 13 ist der ADH-Gehalt im Plasma gegen die jeweilige Plasmaosmolalität so aufgetragen, daß sich zumindest die Andeutung einer Proportionalität erkennen läßt.

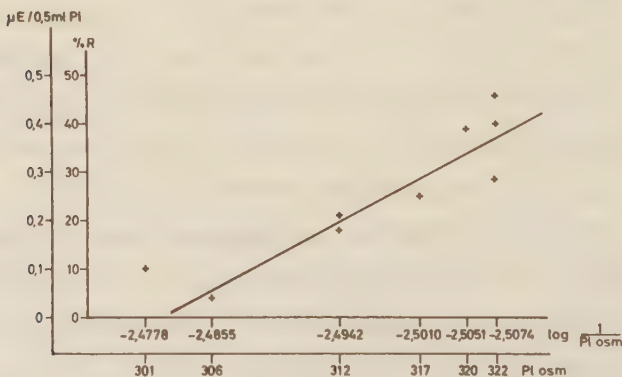


Abb.13 :Graphische Interpolation der prozentualen Retention

(% R) und der ADH-Konzentration ($\mu\text{E}/0,5 \text{ ml}$) in Abhängigkeit vom $\log$ des reziproken Wertes der Plasmaosmolalität ($\log \frac{1}{P_1 \text{ osm}}$) und der Plasmaosmolalität ($P_1 \text{ osm}$).

Exakte Angaben über den Charakter der Kurve können wegen der geringen Anzahl von Messungen nicht gemacht werden. Vermutlich ist die ADH-Ausschüttung nicht nur durch eine bestimmte Höhe der Plasmaosmolalität definiert, worauf schon die Streuung in der Abbildung 13 für $\log \frac{1}{P_1 \text{ osm}} = -2,5074$ ($P_1 \text{ osm} = 322 \text{ mosm/kg H}_2\text{O}$) hinweist, sondern noch von einer Reihe anderer Faktoren abhängig.

Möglicherweise handelt es sich nicht um reine „Osmorezeptoren“, sondern um „Zellvolumenrezeptoren“. Nach dieser Hypothese bewirkt eine extracelluläre Hyperosmolalität eine Flüssigkeitsabgabe aus der Zelle, d.h. es tritt eine Volumenverminderung ein, die den Reiz zur ADH-Ausschüttung darstellt. Die Reizstärke steht also nicht unbedingt in direkter Beziehung zur Höhe der Plasmaosmolalität, sondern zu den Änderungen des Zellvolumens. Eine Osmolalitätssteigerung im Plasma auf 320 mosm kann durchaus verschieden starke Wirkungen auf das Zellvolumen haben, je nach der Größe des interstitiellen Raumes und des flüssigkeitsabgebenden Gesamtzellvolumens.

V. Zusammenfassung

Es wird eine wesentlich verbesserte Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Adiuretin im menschlichen Plasma angegeben.

Die Harnblase von narkotisierten weiblichen Albinoratten werden katheterisiert und jeder ausgeschiedene Urintropfen registriert. Eine Rückkoppelung sorgt für einen der ausgeschiedenen Harnmenge entsprechenden Flüssigkeitsersatz durch iv.-Infusion einer 0,4 %igen NaCl-Lösung.

An den Versuchstieren werden synthetisches Lysin-Vasopressin und menschliches Plasma auf ihre antidiuretische Aktivität, die sich in einer dosisabhängigen Abnahme der Rattendiurese äußert, getestet.

Mit dieser Methode gelingt es, noch Hemmwirkungen von 0,1 $\mu\text{E}/0,5$ ml Injektionsvolumen eines synthetischen Lysin-Vasopressinpräparates reproduzierbar nachzuweisen. Diese gerade noch nachweisbare Vasopressinmenge entspricht ungefähr $4 \cdot 10^{-7}$ gamma Substanz.

Durch die Steigerung der Empfindlichkeit auf den Nachweis von 0,1 μE - bisher lag die Empfindlichkeit im Rattentest bei 3 bis 5 μE - ist es möglich, im Plasma von normal hydrierten Versuchspersonen einen ADH-Gehalt von 0,2 bis 0,4 $\mu\text{E}/1$ ml zu bestimmen.

Ferner wird gezeigt :

1. daß beim Einfrieren von Plasma über mehrere Wochen kein Aktivitätsverlust an antidiuretischer Wirkung auftritt,
2. daß gleiche Art und Mengen synthetischen oder im Plasma vorhandenen Vasopressins innerhalb der Fehlergrenzen bei

wiederholten Testungen in gleicher Weise nachweisbar sind. Dies sowohl in Bestimmungen am gleichen wie auch an verschiedenen Tieren. Dadurch wurde der Beweis für die exakte Reproduzierbarkeit der Methode erbracht.

An Hand von 4 Kriterien gelingt es ferner, die antidiuretische Wirkung des Plasmas mit ADH zu identifizieren.

Im Durstversuch an zwei gesunden Personen zeigt sich nach 24 stündigem Dursten ein Anstieg der Adiuretinkonzentration im Plasma von 0,2 auf 0,8 $\mu\text{E}/\text{ml}$, der nach Wasserbelastung stark absinkt.

Die Experimente zeigen weiterhin, daß für die Ausschüttung von antidiuretischem Hormon die Schwankungen in der Osmolalität bei verschiedenen Hydratationszuständen von Bedeutung sind. Eine quantitative Betrachtung der Änderungen des ADH-Plasmaspiegels und der Osmolalität läßt jedoch den Einfluß weiterer Faktoren auf die ADH-Ausschüttung vermuten.

VI. Literaturverzeichnis

- 1 Ames, R.G. und H.B. van Dyke: Thioglycollate inactivation of posterior pituitary antidiuretic principle as determined in the rat. Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 76, 576, 1951.
- 2 Bartlett, M.F., Jöhl, A., Roeske, R., Stedman, R.J., Stewart, F. H.C., Ward, D.N. und du Vigneaud, V.: Studies on the synthesis of Lysine-Vasopressin, J. Amer. Chem. Soc. 78, 2905, 1956.
- 3 Berde, B. und A. Cerletti: Über die antidiuretische Wirkung von synthetischem Lysin-Vasopressin. Helv. Physiol. Acta, 19, 135, 1961.
- 4 Boura, A. und S.E. Dicker: An apparatus for the maintenance of a constant water load and the recording of urine flow in rats. J. Physiol. (Lond.), 122, 144, 1953.
- 5 Buchborn, E.: Ein quantitativer biologischer Adiuretin- (Vasopressin-) Nachweis an der Kröte. Zschr. exper. Med., 125, 614, 1955.
- 6 Buchborn, E.: Adiuretin und Serumosmolarität. Klin. Wschr., 34, 953, 1956.
- 7 Buchborn, E.: Plasma level of antidiuretic hormone and serum osmolarity in normal human adults. Endocrinology, 61, 375, 1957.
- 8 Burn, H.J., Finney, D.J. und L.G. Goodwin: Biological Standardisation. Oxford University Press, 2nd. ed., 1950.

- 9 Dettelbach, H.R.: A method for assaying small amounts of antidiuretic substances with notes on some properties of vasopressin. *Amer. J. Physiol.*, 192, 379, 1958.
- 10 Dicker, S.E.: A method for the assay of very small amounts of antidiuretic activity with a note on the antidiuretic titre of rats blood. *J. Physiol.*, 122, 149, 1953.
- 11 Drews, G.: Persönliche Mitteilungen. 1963.
- 12 Friedberg, V. und H. Vorherr: Verbesserte Methode zum Adiuretin-Nachweis. *Klin. Wschr.*, 37, 1171, 1959.
- 13 Gauer, O.H. und P. Tata: Persönliche Mitteilungen. 1963.
- 14 Gauer, O.H. und P. Tata: Zum Wirkungsmechanismus von Vasopressin. *Pflüger s Archiv f. ges. Physiologie*, 278, 45, 1963.
- 15 Ginsburg, M. und H. Heller: The antidiuretic assay of vasopressin by intravenous injection into unaesthetized rats. *J. Endocrin.*, 9, 267, 1953.
- 16 Ginsburg, M. und H. Heller: Antidiuretic activity in the blood obtained from various parts of the cardiovascular system. *J. Endocrin.*, 9, 274, 1953.
- 17 Ginsburg, M. und H. Heller: The clearance of injected vasopressin from the circulation and its fate in the body. *J. Endocrin.*, 9, 283, 1953.
- 18 Heintz, R. und E. Schneider: Untersuchungen über die antidiuretische und diuretische Aktivität des Plasmas von Gesunden und Nierenkranken. *Klin. Wschr.*, 35, 819, 1957.

- 19 Heintz, R. und E. Schneider: Diskussionsbemerkung zu:
Vorherr, H. und V. Friedberg; Schröder, R. und D. Rott.
Klin. Wschr., 38, 1113, 1960.
- 20 Heintz, R. und E. Schneider: Osmoregulation und renale
Wasserausscheidung bei ödematösen Herz- und
Leberkranken. Dtsch. Arch. f. klin. Med., 206, 483, 1960.
- 21 Heintz, R. und E. Schneider: Über einen renalen Faktor in der
Pathogenese des Ödems der Spätstadien bei
Herzinsuffizienz und Lebercirrhose.
Medizin. Welt, 3, 130, 1961.
- 22 Heintz, R.: Diurese, Antidiurese und antidiuretisches Hormon.
Münch. Med. Wschr., 15, 800, 1961.
- 23 Heller, H.: Distribution of pituitary antidiuretic hormone
throughout vertebrate series. J. Physiol., 99, 246,
1941.
- 24 Heller, H. und K. E. Blackmore: Assay of small amounts of
antidiuretic injections into mice. J. Endocrin.,
8, 224, 1952.
- 25 Heller, H. und K. Lederis: Paper chromatography of small
amounts of vasopressin and oxytocin. Nature, 182,
1231, 1958.
- 26 Jeffers, J. H., Livezey, H. M. und J. H. Austin: A method for
demonstrating an antidiuretic action of minute
amounts of pitressin: statistical analysis of
results. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 50, 184, 1942.
- 27 Kaufmann, G.: Nachweis einer antidiuretischen Substanz im
normalen menschlichen Urin. Dtsch. Arch. klin. Med.,
200, 419, 1953.

- 28 Labhart, A.: Klinik der inneren Sekretion. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1957.
- 29 Lauson, H. D.: Problem of estimating rate of secretion of antidiuretic hormone in man. Amer. J. Med., 11, 135, 1951.
- 30 Mac Farlane, W. V. und K. W. Robinson: Seasonal changes in plasma of antidiuretic activity produced by a standard heat stimulus. J. Physiol. (Lond.), 1, 135, 1957.
- 31 O Connor, W. J. und E. B. Verney: Effect of removal of posterior lobe of pituitary on inhibition of water diuresis by emotional stress. Quart. J. exp. Physiol., 31, 393, 1942.
- 32 Popenoe, E. A. und V. du Vigneaud: A partial sequence of amino acids in performic acid-oxidized vasopressin. J. Biol. Chem., 206, 353, 1954.
- 33 Schröder, R. und D. Rott: Über die Bestimmung und das Verhalten von ADH im menschlichen Plasma. Klin. Wschr., 37, 1175, 1959.
- 34 Theobald, G. W.: The alleged relation of hyperfunction of the posterior lobe of the hypophysis to eclampsia and the nephropathy of pregnancy. Clin. Sci., 1, 225, 1934.
- 35 Thorn, N. A.: Mammalian antidiuretic hormone. Physiol. Rev., 38, 169, 1958.
- 36 Verney, E. B.: The antidiuretic hormone and the factors which determine its release. Proc. roy. Soc., 135, 25, 1947.

Dank

Ich bedanke mich an dieser Stelle bei Herrn Professor Dr.med. R. Heintz für die Überlassung des Themas. Mein Dank gebührt ferner ihm und seinen Mitarbeitern Herrn Dr.med. D. Renner und Herrn Dr.med. H. Brass für die freundliche Unterstützung bei den Untersuchungen und der Abfassung der Arbeit, sowie Herrn Dr.med. R. Muschaweck für wertvolle experimentelle Anregungen und der Pharmakologischen Abteilung der Farbwerke Hoechst für die Überlassung der Versuchstiere. Der Firma Sandoz AG/ Basel danke ich für die freundliche Abgabe von synthetischem Lysin-Vasopressin.

Lebenslauf

Ich wurde am 18.Mai 1938 in Potsdam als Sohn des damaligen Studienassessors Walter Drews und seiner Ehefrau Lieselotte Drews, geb. Rebentisch, geboren.

Im Herbst 1944 erfolgte meine Einschulung in eine Volksschule in Potsdam. Nach unserer Flucht im April 1945 besuchte ich die Volksschule an unserem neuen Wohnort in Burg/i. Dithm. 1950 wurde mein Vater aus russischer Gefangenschaft entlassen und zog mit uns nach Delmenhorst um, wo ich im Frühjahr 1950 die Aufnahmeprüfung in die Quinta der dortigen Oberschule bestand. Im September 1954 verzogen wir dann nach Wiesbaden. Hier besuchte ich das Realgymnasium am Zietenring und legte dort am 11. März 1958 meine Reifeprüfung ab. Noch im gleichen Jahr wurde ich für 12 Monate zur Ableistung des Grundwehrdienstes zur Marine einberufen, sodaß ich erst im Sommersemester 1959 mit dem Studium der Medizin in Frankfurt/Main beginnen konnte. Nach dem Wintersemester 1961/62 bestand ich hier die ärztliche Vorprüfung. Mein erstes klinisches Semester verbrachte ich im Sommer 1962 in Kiel. Zum Wintersemester 1963 kehrte ich nach Frankfurt zurück und gedenke, mich hier nach Abschluß des 6. klinischen Semesters, Wintersemester 1964/65, im Frühjahr 1965, zum Staatsexamen zu melden.

Ich bin seit dem 31.7.1962 mit der Kandidatin der Medizin Gudrun Drews, geb. Koch, verheiratet.

Eike-Friedrich Drews

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Eine verbesserte Methode zum Nachweis von antidiuretischem Hormon mit Untersuchungen über den Hormongehalt im
menschlichen Plasma.

an der I.Med.Univ.Klin. Frankfurt/Main
unter Leitung von Herrn Prof.Dr.med. R.Heintz

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt. Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen
auszugsweise in ;

Klin. Wschr. , 42 , 771 - 776 , 1964 .

veröffentlicht.

Eike-Friedrich Drews

Meine akademischen Lehrer waren

Anatomie :	Prof.Dr.med. Starck
Physiologie :	Prof.Dr.med. Wezler
Physiologische Chemie :	Prof.Dr.med. Heinz
Pathologie :	Prof.Dr.med. Doerr
Pathologie :	Prof.Dr.med. Rotter
Hygiene :	Prof.Dr.med. Gärtner
Hygiene :	Prof.Dr.med. Herzberg
Innere Medizin :	Prof.Dr.med. Reinwein
Innere Medizin :	Prof.Dr.med. Hoff
Innere Medizin :	Prof.Dr.med. Heintz
Gynäkologie :	Prof.Dr.med. Käser
Pharmakologie :	Prof.Dr.med. Holtz
Chirurgie :	Prof.Dr.med. Geißendörfer
Psychiatrie u. Neurologie :	Prof.Dr.med. Zutt
Geschichte der Medizin :	Prof.Dr.med. Artelt
Augenheilkunde :	Prof.Dr.med. Thiel
Strahlenheilkunde :	Prof.Dr.phil.nat. Rajewsky
Hals-Nasen-Ohrenheilkunde :	Prof.Dr.med. Mittermaier
Kinderheilkunde :	Prof.Dr.med. Weiße
Haut - und	
Geschlechtskrankheiten :	Prof.Dr.med. Herrmann
Gerichtsmedizin :	Prof.Dr.med. Gerchow
Orthopädie :	Prof.Dr.med. Günstz
Naturheilkunde :	Prof.Dr.med. Pirlet

